

高通量测序技术在流产物遗传学检测中的应用

秦凤金 路晓燕 崔萍 唐培红 牛刚 张建海*

(胜利油田中心医院 生殖医学科, 山东 东营 257025)

【摘要】 目的 探讨自然妊娠流产组织染色体异常情况,以及高通量测序技术胚胎停育中的应用价值。

方法 采用高通量测序技术对 97 例胚胎停育样本进行染色体拷贝数变异(copy number variations, CNV)的检测,用相应软件对测序结果进行分析,并将检测数据与基因变异数据库(database of genomic variants, DGV)、人类染色体变异数据库(database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using ensembl resources, DECIPHER) 和在线人类孟德尔遗传数据库(online Mendelian inheritance in man, OMIM)进行比对,确定 CNVs 类型及临床意义。**结果** 97 例标本 93 例成功检测获得高通量测序结果,测序检出率 95.88%,检测出染色体数目异常 47 例,拷贝数变异 23 例,其中 5 例为致病性变异,18 例为多态或致病意义不明。**结论** 染色体异常是胚胎停育的最重要原因,高通量测序技术可以快速准确的检测出常规染色体异常,同时能够检测出常规染色体核型分析无法发现的致病性微失衡,推荐临床上使用对流产物进行测序技术检测查找流产原因。

【关键词】 测序技术; 拷贝数变异; 流产物

【中图分类号】 R714.21 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To investigate the application of NGS in spontaneous abortion. **Method** NGS were performed to detect for genome-wide copy number variations(CNVs) in 97 fetuses with spontaneous abortion. All identified CNVs were analyzed with the references from database of Genomic of variant (DGV), database of DECIPHER, ISCA and OMIM. **Results** 93 of 97 specimens could be successfully detected. We identified clinically significant chromosomal aberrations in 54.73% of tested fetuses(52/95). Among them, 47 aneuploids and 5 abnormal CNVs were identified. **Conclusions** The main causes of spontaneous abortion are chromosome aberrations. NGS is a fast and effective method to detect the samples from spontaneous abortion. This technology is recommended to be applied to clinical.

【Key words】 Sequencing technology; Variation of copy-number; spontaneous abortion

自然流产的发病率约 15%~20%,且有逐年上升的趋势,其发病原因与环境因素、孕妇内分泌疾病、免疫疾病、遗传学因素等密切相关。有研究表明,遗传学因素在早期流产中起主导作用^[1]。流产物的遗传学检测能够提供胚胎流产的遗传学原因,减少由于不明原因流产导致不必要的诊疗,对于进一步生育指导具有重要意义,近年来,随着高通量测序技术的迅猛发展,使得测序技术用于染色体拷贝数变异(copy-number variation, CNVs)检测的优

越性越来越明显,基于高通量测序技术在胚胎流产物遗传检测临床应用尚处于起步阶段,我们应用该技术对 97 例不明原因流产患者的绒毛或胎儿组织进行检测,探讨测序技术在染色体疾病上的应用和拷贝数变异在流产物检测中的应用价值。

1 对象与方法

1.1 对象 选取 2015 年 5 月至 2018 年 5 月在胜利油田中心医院生殖医学科就诊的胚胎停育的 97 例孕妇,年龄 24~43 岁,平均年龄 31 岁,孕周为 7~25 周。均为自然妊娠。初次流产 48 例,2 次及

以上流产史 49 例。检测前均签署知情同意书。

1.2 方法 取流产物 10 mg, 无菌 PBS 缓冲液冲洗后, 提取 DNA, 超声波打断, 酶补齐, 加接头 A, 构建测序文库。多个测序文库 index 标记后测序, 测序采用美国 Illumina 公司型号为 HiSeq2000 高通量测序仪器进行检测。将同一个样本检测到的几百万条独立的 DNA 序列与已知人类参考基因组比对, 得到唯一匹配序列, 及其在基因组上的位置; 再将基因组上每条染色体划分为连续的测序窗口, 统计待测样品每个窗口中唯一比对序列数目与正常对照相对应窗口中唯一比对序列数目的比值, 计算出待测样品在该窗口位置的拷贝数, 连接拷贝数相近的连续测序窗口作为同一检测片断, 重新计算该检测片断内的拷贝数(SCN)作为检测值。根据检测值判断对应染色体检测区域的检测结果为单倍体、二倍体、多倍体或嵌合等。检测数据与基因变异数据库(DGV)、人类染色体变异数据库 DECIPHER) 和在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM) 进行比对, 确定 CNVs 类型及临床意义。此外, 应用 STR 技术对母亲 DNA 以及流产物 DNA 进行 STR 分析, 排查母源污染的可能性。

2 结果

97 例流产及死胎患者, 4 例母源性污染, 共 93 例有结果, 检测成功率 95.88%。

2.1 染色体异常在不同孕期检测情况 早孕期流产胚胎染色体异常约占 64.47%(49/76), 中晚孕期的流产及死胎染色体异常约占 11.76%(2/17), 二者相比差异具有统计学意义。

表 1 不同孕周染色体检测结果(例)

	CNV-seq 正常及多态	CNV-seq 意义不明	CNV-seq 异常	χ^2	P
<12 周(76 例)	22	5	49		
>12 周(17 例)	10	5	2	37.61	<0.05

2.2 染色体数目异常检测情况 共检出染色体数目异常 47 例, 涉及绝大多数的染色体, 其中三体 33 例、单体 6 例、嵌合 3 例、三倍体 2 例、四倍体 1 例, 最常见异常的是 16-三体及特纳综合征(图 1)。

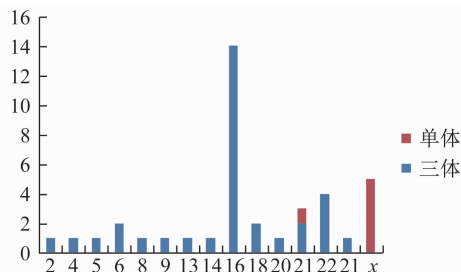


图 1 染色体非整数倍体数目异常类型及例数

2.3 染色体基因组拷贝数检测情况 共检出染色体拷贝数变异 23 例, 查询 DGV、OMIM、DECIPHER 数据库, 5 例注释为各类缺失重复综合征, 18 例注释为多态性或致病性未知, 多数改变在同样本中既有缺失又有重复, 测序微缺失微重复检出率为 24.73%(23/93)(表 2)。

2.3.1 染色体基因组拷贝数变异检测查询数据库 注释为微缺失微重复综合征的 5 例, 检出率为 5%(5/93)。这 5 例测序拷贝数变异的片段缺失有 1.52Mb、20.42Mb, 重复片断有 0.4Mb、5.4Mb、33.3Mb, 1 例同时有 34.32 Mb 的缺失和 99.48Mb 的重复。

2.3.2 染色体基因组拷贝数变异查询数据库 注释为多态 8 例, 缺失或重复片段以 <1 Mb 为主, 片段大小 0.32~1.76 Mb; 查询数据库界定为致病性未知的 10 例, 片段大小 0.16~1.5 Mb。

2.4 染色体异常与流产次数的关系 染色体异常与自然流产的次数没有相关性($P>0.05$)(表 2)。

表 2 流产次数与染色体异常的关系(例)

	染色体正常	染色体异常	χ^2	P
1 次自然流产(54 例)	21	33		
2 次自然流产(19 例)	8	11		
3 次及以上自然流产(11 例)	4	7	0.10	0.95

3 讨论

3.1 NGS-CNVs 技术在提高流产物检测成功率方面的优势 近年来自然流产发生率不断升高, 不明原因的流产和死胎给患者及其家庭带来极大心理负担。胚胎染色体异常是导致胚胎停止发育的最主要原因。传统的细胞培养染色体核型分析被认为是诊

断染色体非整倍体及异位等染色体病的“金标准”,但其检测失败率较高,文献报道达5%~42%^[2],而且培养需要无菌,对药物流产和自然流产的绒毛无法检测,且基层医院大多不具有染色体核型分析的能力,也无法将标本送至检验中心检测。近期,高分辨率寡核苷酸和单核苷酸多态性微阵列技术(single nucleotide polymorphism array, SNP array)也被用于流产绒毛的检测,能在更广范围内进行染色体异常的检测,可发现具有临床意义的、小于5Mb的染色体微缺失/微重复,但因技术难度高、相关人员缺少专业知识和高成本等原因尚未得到广泛运用。随着无创DNA检测技术的普及,很多医院建立了高通量基因测序平台,梁德生等^[3]报道染色体疾病检测方面CNV-seq与SNP array具有高度的检测一致性,且测序试剂的成本将随着时间的推移而显著降低,加之工作流程简单,CNV-seq有望成为比微阵列技术更具扩展性且经济实惠的染色体疾病检测替代技术。本研究对于流产组织进行高通量测序CNVs检测97例,成功检测93例,失败4例,培养成功率达95.88%,检测失败的样本均是由于通过STR实验,在待测流产物组织中检测到了母血的“外来信号”,表明待测流产物样本中有母血污染,未通过质控。因此,在留取绒毛组织时应反复漂洗标本,尽量洗去肉眼能够分辨的陈旧积血及蜕膜组织。

3.2 本研究检测成功的93例标本中,其中染色体数目异常共47例,微缺失微重复综合征5例,多态性8例,致病性未知10例。染色体非整倍体改变仍然是流产胚胎的主要因素,大多是三体,单倍体除45,X外,其他少见,增加的染色体几乎涉及了大多数染色体,16号染色体最为常见,其他染色体均衡分布,也未见集中在13号、18号、21号上,所以临床上曾经选用原位荧光杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)做流产物分析,因探针受限,仅用13号、16号、18号、21号、X、Y染色体探针来进行流产物分析是意义不大的,检出率低下。本次实验中共检出3例嵌合体,分别是47,XN,+22[70%]/46,XN[30%]、45,X[50%]/46,XY[50%]和45,X[85%]/46,XY[15%],提示高通量测序对嵌合体的检测也较敏感,可检出约15%的嵌

合体。

3.3 高通量测序异常信号对于提示染色体微缺失、微重复等也具有较高的灵敏度和特异性,可以检出常规染色体核型分析无法发现的染色体微缺失、微重复。染色体微失衡可能是导致胚胎自然流产的原因之一。本研究中,高通量测序技术能够准确地检测染色体非整倍体的同时,检测到5例致病性微失衡综合征。由于高通量测序技术的灵敏度、分辨率高,能够检测到不小于100kb的微小缺失及重复。对于测序结果的遗传咨询与解读是目前临床遗传咨询中存在的问题。本研究显示,97例测序样本中检测到多态性的CNV 8例、致病性未知CNV 10例。致病性未知的染色体拷贝数改变仍占结果的较大比例,对于高通量测序检测到大量致病性未知的遗传信息,目前是否具有临床意义尚存在争议,为临床遗传咨询提出新的挑战。随着遗传公开数据库的不断更新,越来越多有临床意义的微失衡将不断被证实。分子遗传诊断技术将逐渐在临床工作中起到重要作用。随着对疾病的遗传学了解的不断加深,致病性未知临床病例的积累,其临床意义与相关疾病的关系有待进一步的研究。Desheng等^[4]研究证实当CNVs缺失及重复片段大小未达到一定量时,可能会由于缺失及重复部分基因能够得到一定的基因补偿而不出现临床症状,当CNVs微失衡不能得到相应的补偿时会导致临床症状的出现,本研究中5例有致病意义的CNV中其中3例染色体拷贝数改变均超过20M。97例流产物检测中,测序显示多态8例,还有10例检测阳性查询后显示致病性未知,而这些都是流产物中检出的,是否有致病效应存在一定争议,在公共数据库中查出致病性未知的这一部分是需要更多的积累,更进一步地研究改变和致病性间的关系。

3.4 流产组织染色体异常与流产次数无关,本研究结果显示二次及以上流产和偶发性流产患者的染色体异常率分别是60%和61%,差异无统计学意义。Grande等^[5]报道了96例复发性流产者的绒毛染色体异常率为60%,154例偶发性流产者的异常率为68%,差异也无统计学意义,与本研究结果基本一致,提示流产组织染色体异常的风险与流产次数无关。

3.5 流产组织染色体异常与流产时间具有相关性, 本研究结果显示孕 12 周发生的流产, 染色体异常约占 65%, 而 12 周后发生的流产及死胎, 染色体异常约占 11%, 差异具有统计学意义。这说明染色体异常是造成胚胎早期丢失的一个重要原因。自然流产可能是人体对于有染色体异常胚胎的自然淘汰过程。明确流产组织的染色体核型, 可以减轻患者心理负担, 为患者再生育指导提供可靠依据。

总之, 基于高通量测序技术的基因组拷贝数目变异检测, 用于流产物染色体微缺失、微重复的遗传学检测具有可行性。NGS-CNVs 可以快速准确地检测出常规染色体异常, 同时能够检测出常规染色体核型分析无法发现的致病性微失衡, 并且发现大量致病性未知的微失衡, 其临床意义有待进一步证实。

参 考 文 献

[1] Du Y, Chen L, Lin J, Zhu J, et al. Chromosomal karyotype

in chorionic villi of recurrent spontaneous abortion patients [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(1):32-39.

[2] Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, et al. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2004, 30(3):237-241.

[3] Liang D, Peng Y, Lv W, et al. Copy number variation sequencing for comprehensive diagnosis of chromosome disease syndromes [J]. *J Mol Diag*, 2014, 16(5):519-526.

[4] Wang JW, Kurahashi H, Ishii A, et al. Microchromosomal deletions involving SCN1A and adjacent genes in severe myoclonic epilepsy in infancy [J]. *Epilepsia*, 2008, 49(9):1528-1534.

[5] Grande M, Borrell A, Garcia-Posada R, et al. The effect of maternal age on chromosomal anomaly rate and spectrum in recurrent miscarriage [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(10):3109-3117.

(收稿日期:2019-01-12)

编辑:宋文颖